Gouvernement du Canada
Government of Canada

Service canadien des forêts
Canadian Forestry Service

Techniques d'électrophorèse sur gel d'amidon des enzymes d'essences d'arbres forestiers

W. M. Cheliak et J. A. Pitel

Rapport d'information PI-X-42F
Institut forestier national de Petawawa

86-1388/

TECHNIQUES D'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AMIDON DES ENZYMES D'ESSENCES D'ARBRES FORESTIERS

Rapport d'information PI-X-42F

W.M. Cheliak et J.A. Pitel

Institut forestier national de Petawawa
Service canadien des forêts
1985

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1985
N° de catalogue Fo46-11/42-1985F
ISSN 0228-0736
ISBN 0-662-92784-2

Des exemplaires de cette publication peuvent être obtenus à l'adresse suivante:

Centre d'information technique et de distribution
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

Téléphone: 613 589-2880

This publication is also available in English under the title **Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species.**

Table des matières

i Résumé/Abstract

ii Préface

1 1 Introduction

1 1.1 Aperçu des méthodes d'électrophorèse

2 2 Tissus destinés à l'analyse

2 2.01 Types de tissus

2 2.011 Semences
3 2.012 Tissus végétatifs

3 2.1 Reproduction sexuelle chez les conifères

3 2.12 Modes opératoires d'échantillonnage pour divers types d'informations

4 2.121 Patrimoine et liaisons
4 2.122 Distribution des génotypes
4 2.123 Distribution des fréquences des gènes
5 2.124 Préparation des échantillons

5 2.2 Reproduction sexuelle chez les angiospermes

5 2.3 Types de matières végétatives

6 2.31 Bourgeons
6 2.32 Feuilles matures

6 2.321 Angiospermes
6 2.322 Gymnospermes

7 2.33 Racines, écorces et tissus cambiaux

7 3. Préparation de l'homogénat

7 3.1 Matériel
7 3.11 Homogénéisation mécanique
8 3.12 Broyage manuel

8 4 Languettes d'échantillons

8 4.1 Dimensions
9 4.2 Poids
9 4.3 Insertion dans l'homogénat

9 5 Préparation du gel d'amidon et électrophorèse

9 5.1 Moules à gel et cuves à solution tampon
9 5.2 Préparation du gel
11 5.3 Insertion des échantillons dans le gel
11 5.4 Introduction des protéines dans le gel et essais

11 6 Découpage et coloration

11 6.1 Découpage des gels
12 6.2 Coloration des gels

12 7 Notation des variantes allozymatiques

13 Remerciements

15 Annexe I
17 Annexe II
45 Annexe III

Figures

4 1. Composition génotypique d'une semence de conifère mature.
8 2. Dispositif d'homogénéisation pour tissus végétatifs et semences.
10 3. Moule à gel.
10 4. Moule à gel et cuve à tampon muni d'électrodes.
12 5. Gel hypothétique présentant des variantes allozymatiques à deux loci.

RÉSUMÉ

On présente le mode opératoire détaillé de l'électrophorèse des protéines d'essences forestières en gel d'amidon. Des parties précises de la publication traitent de la manipulation des tissus haploïdes (mégagamétophytes des conifères) et des tissus diploïdes (embryons, feuilles, bourgeons, aiguilles et tissus des conifères et des angiospermes). Dans plusieurs annexes on donne, dans leurs grandes lignes, des renseignements sur l'extraction, les électrodes, les solutions tampons ainsi que des recettes de coloration des enzymes pour les différentes essences forestières. Une bibliographie permet d'accéder aux publications traitant des applications de l'électrophorèse à l'étude des populations d'arbres forestiers.

ABSTRACT

Methods are presented which fully describe the process of protein starch gel electrophoresis for forest tree species. Specific sections deal with procedures for haploid tissues (megagametophytes from conifers) and diploid tissues. The diploid tissues discussed include embryo, leaf, bud, needle, and bark tissues of both conifer and angiosperm species. Several appendices outline extraction, electrode, and gel buffers, and enzyme staining recipes used for forest tree species. A bibliography is included that allows access to literature dealing with applications of electrophoresis to the study of forest tree populations.

PRÉFACE

Le présent manuel est destiné à faire profiter d'autres chercheurs de notre expérience en électrophorèse de tissus d'arbres. Nous espérons que ce manuel sera utile à ceux qui mettent sur pied un laboratoire d'électrophorèse, ainsi qu'à d'autres qui sont familiers avec cette technique, mais qui commencent à l'appliquer aux arbres. Étant donné que notre laboratoire fonctionne dans un cadre d'heures de travail régulières, il est nécessaire que les analyses ordinaires soient effectuées dans des journées de travail de huit heures. Notre contribution à la solution de ce problème est présentée.

Les colorants d'enzymes coûtent cher; donc, plus on colore de plaques de gel de silice par enzyme par jour, plus le coût total d'une expérience sera bas. Compte tenu de ceci, on peut espérer que le présent manuel sera utile en permettant d'effectuer des expériences plus complètes sans dépenses additionnelles de temps ou d'argent.

Il n'est pas possible de faire fonctionner deux laboratoires de la même façon à cause des différences de personnel, d'équipement et d'installations. Donc, le but principal du présent manuel est de décrire les principes généraux plutôt que les modes opératoires particuliers.

Dans l'annexe III, on présente une bibliographie dont les références ont été choisies de façon à faciliter la consultation d'une documentation importante.

TECHNIQUES D'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AMIDON D'ENZYMES D'ESSENCES FORESTIÈRES

1 INTRODUCTION

L'étude des caractères quantitatifs pour l'amélioration des récoltes a été et reste la base essentielle de la sélection des phénotypes dans les programmes de reproduction. Toutefois, l'aptitude de ces caractéristiques à fournir des mesures des variations génétiques à l'intérieur des populations, ainsi que des estimations des similitudes génétiques chez celles-ci, est limitée par le temps et la précision de l'expression génétique. Normalement, le temps nécessaire pour l'expression des caractères par rapport avec le rendement se mesure en années dans le cas des essences forestières. De plus, les caractères des phénotypes sont sujets à des modifications environnementales et plusieurs sont d'origine polygénétique, c'est-à-dire qu'elles sont contrôlées par plusieurs gènes et des interactions génétiques qui ne peuvent être définies. Par conséquent, les interférences de la structure génétique sont nécessairement obtenues indirectement à partir d'études de variations de phénotypes.

Par rapport à des caractéristiques quantitatives polygénétiques, les études par électrophorèse des variantes allozymatiques (allèles) d'isozymes associés à des locus spécifiques de gènes permettent des évaluations directes des variations génétiques qui peuvent survenir à l'intérieur d'une population et d'une population à l'autre. Ces marqueurs génétiques ne sont pas communément associées à ces caractères phénotypiques et l'on s'attend à ce qu'ils soient de nature neutre, c'est-à-dire à ce qu'ils agissent comme des allèles aléatoires qui ne sont pas influencés par la sélection naturelle ou dirigée. En outre, les techniques électrophorétiques permettent de poser différents ensembles de questions pour ce qui est de la quantité, de la distribution et de l'entretien des variations génétiques dans des populations naturelles et artificielles. Appliquée à la reproduction naturelle ou artificielle des populations, cette technique permet aux chercheurs de certifier les types de verger, les familles et les banques de clones, ainsi que de surveiller les processus de reproduction dans les zones de production de semences, les zones de collection des semences ou les vergers à semences. Un autre avantage est que des résultats peuvent souvent être obtenus après quelques mois plutôt qu'après quelques années.

Il existe une grande diversité de tissus qui peuvent être utilisés pour l'analyse par électrophorèse. Toutefois, le choix du type de tissus le plus approprié dépend souvent directement de l'espèce et des questions posées. Il est donc très important que ces questions soient clairement formulées avant l'échantillonnage.

1.1 APERÇU DES MÉTHODES D'ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse est un procédé selon lequel les protéines, introduites dans un tamis moléculaire, sont forcées à migrer à travers ce tamis sous l'influence d'un courant électrique. La distance totale de migration d'une protéine dépend du pH du système tampon, de la charge électrique nette de la protéine et de sa structure tridimensionnelle.

Le tamis moléculaire peut être composé de plusieurs substances chimiques différentes, par exemple le papier, la gélose, l'acrylamide et l'amidon. Toutefois, nous n'étudierons que le cas de l'électrophorèse horizontale sur gel d'amidon dans le présent manuel. Cependant, peu importe le milieu, le mode opératoire de base et les principes ne varient pas.

Les gels d'amidon comportent plusieurs avantages par rapport aux autres milieux pour les études de population. Le plus important de ceux-ci est probablement la possibilité de déterminer le génotype d'un individu pour un grand nombre de locus lors d'un même essai. Ceci permet la détermination rapide de la composition génétique d'une population ou de l'identité de plusieurs locus d'un individu.

Pour les études génétiques des populations ordinaires, les protéines sont absorbées sur des languettes de papier à partir

W.M. Cheliak, chercheur, et J.A. Pitel, biologiste, travaillent à l'Institut forestier national de Petawawa.

Publication approuvée le 2 octobre 1984.

d'un homogénat brut préparé à partir de tissus choisis. Habituellement, la préparation de l'homogénat brut nécessite le broyage de tissus choisis dans un tampon d'extraction approprié. Après que les languettes aient été insérées dans les gels, on applique une tension au système et la migration du front du tampon est surveillée sur une distance d'environ 6-8 cm (env. 4-5 heures d'électrophorèse). Les gels sont ensuite découpés horizontalement en tranches d'environ 1-2 mm d'épaisseur qui sont utilisées pour rendre visibles les protéines enzymatiques particulières. Après que les zones d'activité enzymatique aient été développées, elles sont caractérisées et évaluées en fonction des différents systèmes enzymatiques à l'étude.

En plus de fournir les modes opératoires généraux pour l'électrophorèse sur gel d'amidon, nous examinons les types de tissus qui peuvent être utilisés et certaines des données qui peuvent être obtenues à partir de ces tissus. Des méthodes expérimentales particulières sont indiquées pour différents types de tissus de conifères et d'angiospermes.

2 TISSUS DESTINÉS À L'ANALYSE

Plusieurs types de tissus peuvent être recueillis pour les études d'électrophorèse. Du type de tissus recueillis dépendent non seulement le mode opératoire analytique employé, mais aussi les données qui peuvent être recueillies. À cause de la biologie de leur reproduction, les conifères présentent une grande variété de données qui peuvent être recueillies. Toutefois, les chercheurs doivent connaître exactement quelles données sont requises afin de les obtenir de la façon la plus efficace.

Les aiguilles matures des espèces de conifères sont probablement les tissus les plus difficiles à analyser par électrophorèse. En général, les tissus végétatifs matures des feuilles persistantes sont riches en tanins, en quinones, en phénols et en flavonoïdes, etc. Ces composés se lient au site actif de la plupart des enzymes, et rendent difficiles la plupart des études à grande échelle basées sur un grand nombre d'enzymes. Toutefois, plusieurs modes opératoires ont été élaborés dans notre laboratoire pour rendre possibles des expériences à grande échelle basées sur un grand nombre de systèmes enzymatiques (Pitel et Cheliak 1984). Il est possible d'analyser un grand nombre de génotypes d'une façon relativement aisée.

Nous décrirons d'abord les variétés de tissus qui peuvent être analysés, les modes opératoires utilisés et les données qui peuvent être obtenues.

2.01 Types de tissus

2.011 Semences

En général, les semences des arbres forestiers sont intéressantes pour l'étude par électrophorèse des variations génétiques. Voici certains des avantages et des désavantages de leur utilisation:

Avantages

1. Conditions de stockage bien connues pour la plupart des espèces.
2. Faible volume requis pour stocker un grand nombre de génotypes.
3. Conditions de stockage optimal habituellement faciles à obtenir.
4. Tissus relativement "propres" (c'est-à-dire exempts de tanins, de phénols, etc.).
5. Chez les conifères, il est possible d'effectuer des études de patrimoine et de liaisons directement, sans croisement.

Désavantages

1. La périodicité des récoltes de semences peut restreindre de façon importante l'importance et le type d'échantillon qui peut être collecté.
2. On ne peut échantillonner que les individus sexuellement matures.
3. La faible germinabilité et/ou les conditions spéciales requises à cause de la dormance imposent des limites pour l'échantillonnage ou les ressources de certaines espèces.
4. Chez les angiospermes, seuls les embryons sont appropriés pour une étude de la variation génétique des populations. Toutefois, ce type de

génération filiale peut ne pas être en mesure de fournir les données appropriées pour répondre à certaines questions.

5. Chez les conifères, l'utilisation de tissus gametophytiques haploïdes pour déterminer la structure du génotype d'une population est la façon la moins efficace et la plus coûteuse en temps et en argent pour recueillir les données requises.

6. Sauf dans le cas des conifères à cônes sérotineux, la cueillette de semences doit être faite pendant une période relativement courte à la fin du printemps ou au début de l'automne. Cette contrainte temporelle peut être à l'origine de problèmes de logistique pour l'organisation et l'exécution de cueillettes à grande échelle d'une espèce.

2.012 Tissus végétatifs

Aux fins du présent travail, nous définissons les tissus végétatifs comme les tissus représentant directement le génotype de l'individu dont ils ont été prélevés. Ainsi, nous pouvons considérer les racines, les feuilles, les bourgeons, le tissu cortical, etc., comme des tissus végétatifs.

Avantages

1. Le génotype diploïde est exprimé directement en gymnospermes et en angiospermes.

2. Les plantes peuvent être échantillonnées à toute étape de leur développement, de la semence à la plante mature.

3. La plupart des tissus sont disponibles pendant presque toute l'année.

4. Les échantillons peuvent inclure autant d'individus d'une population qu'il en faut.

Désavantages

1. Les conditions de stockage à long terme en laboratoire sont inconnues pour la plupart des espèces.

2. L'espace de stockage peut être très important par rapport à un échantillon comparable de génotype à base de semences.

3. Le stockage peut nécessiter des conditions spéciales (c'est-à-dire un congélateur biologique à très basse température).

4. Les tissus sont souvent très "sales" (c'est-à-dire riches en phénols, etc.).

5. Le patrimoine et les liaisons doivent être confirmés (étude de lignée).

2.1 REPRODUCTION SEXUELLE CHEZ LES CONIFÈRES

Les processus de reproduction sexuelle chez les conifères peuvent être à l'origine d'avantages et de problèmes pour les méthodes d'électrophorèse si leurs implications ne sont pas très bien comprises. Dans la structure reproductive femelle, la méiose résulte en une tétrade linéaire de quatre gamètes. Les trois gamètes non polaires dégénèrent, ne laissant qu'une cellule haploïde. Cette cellule subit un processus de reproduction végétatif (mitose) qui produit une grande masse de cellules non différenciées. Selon le genre, ce procédé peut nécessiter jusqu'à 13 mois. La plupart de ces cellules se différencient éventuellement de façon à former un tissu nutritif (endosperme = mégagamétophyte) et plusieurs archégones. Le point à retenir est que cette masse de tissus provient d'une seule cellule haploïde et reste dans cette condition après la fertilisation. L'embryon mature est diploïde et a hérité du même génotype haploïde que le mégagamétophyte, avec en plus la contribution paternelle haploïde du pollen lors de la fertilisation (figure 1).

2.12 Modes opératoires d'échantillonnage pour divers types d'informations

Ce système reproductif permet l'extraction d'un grand nombre de types différents d'informations. Donc, il est très important que le chercheur connaisse exactement le type d'information qui est requis avant de commencer une étude basée sur des tissus haploïdes de conifères sexuellement matures.

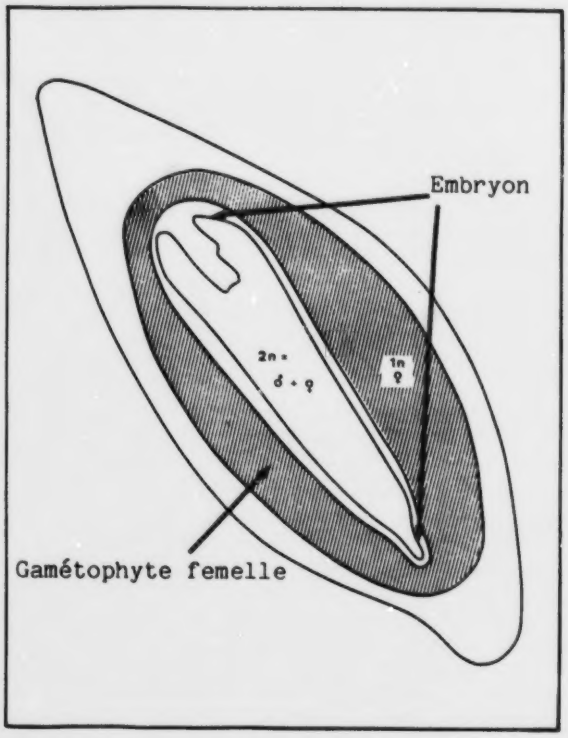

Figure 1. Composition génotypique d'une semence de conifère mature.

2.121 Patrimoine et liaisons

Etant donné le système reproductif des conifères, nous pouvons effectuer des études de patrimoine et de liaisons sans croisement. Si un arbre est hétérozygote à un locus particulier de gènes, la moitié des gamètes (mégagamétophytes) incluera un allèle (par exemple A) et le reste, l'autre allèle (soit a), si le locus du gène se comporte en mode mendélien simple. Ainsi, nous pouvons élaborer une hypothèse nulle à vérifier selon laquelle, dans un arbre hétérozygote, la ségrégation des allèles (A, a) est de 1:1 à un locus simple. Parce que l'analyse d'un mégagamétophyte dépend de la pollinisation et de la fertilisation, cette hypothèse suppose nécessairement qu'il n'y a aucune distorsion due à la ségrégation, que la ségrégation est observée à la méiose, et que les embryons séparés, y compris les allèles maternels A et a, sont également adéquats.

Pour vérifier les liaisons, supposez qu'un individu est hétérozygote pour deux allèles à deux locus, par exemple Aa et Bb. Si ces deux locus ne sont pas liés, une distribution 1:1:1:1 des gamètes AB Ab aB ab devrait être observée. Ainsi, nous pouvons tester toutes les [n(n-1)]/2 paires de locus hétérozygotes d'un individu pour rechercher toute liaison à l'aide du test de X^2 ou d'une analyse de ressemblance maximum G ou G^2.

2.122 Distribution des génotypes

Nous pouvons prévoir le génotype d'un individu à l'aide des cellules haploïdes. La probabilité de l'identification correcte d'un hétérozygote, compte tenu du fait qu'il s'agit d'un hétérozygote, dépend de la fonction de densité $P_h = 1-[(1/2)^{n-1}]$, où n est le nombre de mégagamétophytes et P_h est la probabilité d'observer un hétérozygote. En analysant huit mégagamétophytes, la probabilité d'observer un hétérozygote est supérieure à 0,996. Toutefois, ces données représentent simplement la constitution diploïde d'un individu. Ainsi, si on utilise des mégagamétophytes simples, il faut de 8 à 10 fois plus de travail, de temps et d'argent pour obtenir le génotype diploïde d'un individu que par observation directe des tissus somatiques. Si les données requises sont celles des génotypes individuels, il est préférable de préparer un certain nombre de mégagamétophytes (non inférieur à 8), de les broyer simultanément et d'en déterminer directement le génotype diploïde. Généralement, quand on travaille avec des conifères, une analyse de patrimoine et de liaisons sera effectuée avant que l'étude principale ne soit entreprise. A partir de cette étude, les phénotypes diploïdes à l'état de gel provenant des mégagamétophytes regroupés peuvent être construits à partir d'hétérozygotes connus pour permettre l'interprétation facile des cas individuels inconnus.

2.123 Distribution des fréquences des gènes

Le mégagamétophyte haploïde peut également être utilisé pour déterminer la fréquence des distributions de gènes obtenus à partir d'échantillons groupés de semences d'un certain nombre de parents. Ce mode opératoire est une simple numération des différents allèles observés dans un échantillon groupé, suivie d'une division par la taille de l'échantillon.

Pour la plupart des locus polymorphes d'une population, un échantillon groupé de 30 à 50 individus (dont chacun contribue approximativement à une quantité égale de semences) suffira. L'analyse ultérieure

d'environ 2N-2,5N (N est le nombre d'individus mis à contribution) mégagamétophytes produira une évaluation raisonnable de la fréquence des allèles dans cette population. Parce que la plupart des chercheurs réduisent les ensembles de données de génotypes en fréquence des gènes, cette méthode permet d'obtenir rapidement et à peu de frais des évaluations précises de la fréquence des gènes. Si une distribution approximative des génotypes est requise, elle peut être obtenue à partir de l'équilibre de Hardy-Weinberg (c'est-à-dire $p^2:2pq:q^2$, où $p+q=1$) supposons un appariement au hasard.

2.124 Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être préparés à l'aide de techniques normalisées requises pour éliminer l'effet de la dormance chez les espèces qui nécessitent un prétraitement avant la germination. Les semences traitées sont placées sur un papier filtre dans une boîte de pétri en plastique et imbibées d'eau à la température ambiante pendant au moins 24 heures. L'eau en excès est ensuite éliminée et les échantillons sont placés au réfrigérateur à 4°C. Toutefois, il est à conseiller d'effectuer des expériences préliminaires en laissant les semences germer pendant des périodes variables afin de déterminer l'état de l'activité enzymatique maximale.

Les cuticules des semences traitées sont enlevées et les embryons sont excisés pour la préparation de l'extrait d'enzymes. Cette tâche plutôt fastidieuse est facilitée par l'utilisation d'une bonne paire de forceps chirurgicaux à bouts pointus. La plupart des espèces ont la cuticule divisée en deux moitiés, et une pression exercée sur la zone de tension fendra l'exine et exposera le mégagamétophyte. Une incision est effectuée dans la partie supérieure de la semence dénudée pour permettre l'explusion de l'embryon par l'incision grâce à une légère pression en bas. Selon l'expérience, les embryons peuvent être rejetés ou conservés.

Les mégagamétophytes sont placés seuls dans des godets d'auto-analyseur de 0,5 ml. Une goutte de tampon d'extraction de semence (annexe I) est ajoutée à chaque godet. Les godets sont recouverts de pellicule Saran ou de couvercles de plastique bien ajustés et placés au réfrigérateur pour les préparer à l'homogénéisation le lendemain matin.

S'il faut déterminer également le génotype des embryons, on ajoute habituellement environ 15 % de tampon d'extraction végétative I (annexe I) au tampon d'extraction de la semence. Ces proportions peuvent être ajustées selon l'âge des embryons à l'étude.

2.2 REPRODUCTION SEXUELLE CHEZ LES ANGIOSPERMES

L'endosperme des angiospermes est triploïde (2n, 1n), avec un embryon diploïde. Donc, l'endosperme ne constitue pas un tissu approprié pour déterminer directement le génotype d'un individu, et les embryons doivent être utilisés pour caractériser la population. Toutefois, de graves erreurs peuvent résulter de cette méthode si l'on ne prend pas en compte le système d'appariement.

Dans le cas des échantillons de tissus végétatifs, nous observons directement le génotype diploïde d'un individu. Il peut y avoir des problèmes quand on interprète des profils de bandes du point de vue de leur importance génétique. Si l'on n'effectue pas de croisements confirmatoires et si l'on ne dispose pas de données sur les lignées, nous ne pouvons faire que des déductions raisonnables concernant les locus des gènes.

Une étude portant sur de grandes populations et un certain nombre de locus de gènes peut être effectuée très rapidement à l'aide de produits diploïdes. Dans notre laboratoire, nous pouvons déterminer le génotype de jusqu'à 200 individus par jour, caractérisant chacun en fonction de 33 systèmes enzymatiques différents. Ainsi, dans 20 jours-laboratoire, une quantité considérable de données peut être recueillie à des coûts relativement peu élevés.

2.3 TYPES DE MATIÈRES VÉGÉTATIVES

La plupart des tissus vivants d'une plante mature peuvent être utilisés pour une étude par électrophorèse de la variation génétique. Toutefois, il faut tenir compte de plusieurs facteurs quand on planifie la collecte de l'étude initiale. La facilité de la cueillette et du stockage du tissu doivent être un critère important. Les semences sont relativement faciles à stocker. Toutefois, étant donné la périodocité de la récolte des semences, ou s'il peut être intéressant de connaître la

structure de la population mature, il peut être nécessaire de prélever les échantillons directement sur des plantes matures plutôt que d'échantillonner la population filiale. L'échantillonnage direct du stock existant peut être nécessaire si la population à l'étude n'est pas sexuellement mature. Nous décrirons divers types de tissus qui peuvent être échantillonnés, ainsi qu'un mode opératoire approprié d'homogénéisation pour chacun.

2.31 Bourgeons

Nous préférons les bourgeons aux autres types de matières végétatives "sales". Dans les zones tempérées, les bourgeons sont disponibles en dormance pendant 6-8 mois. Avec ce tissu, il est facile de standardiser une position d'échantillonnage et de type de bourgeon (végétatif ou reproductif). Les conditions de stockage nécessitent généralement la congélation dans un congélateur horizontal pendant au moins un an. Nous avons réussi à extraire des enzymes de bourgeons végétatifs de la plupart des espèces caduques ou de conifères. Les bourgeons présentent l'avantage additionnel de ne pas être riches en phénol et en métabolite secondaire dénaturant comme c'est le cas de la plupart des autres types de tissus végétatifs matures. La mécanisation du processus d'homogénéisation est très simple. Normalement, 10-50 mg de tissus sont plus que suffisants pour donner assez d'homogénat brut pour 4-5 languettes.

2.32 Feuilles matures

2.321 Angiospermes

Le stockage à long terme de feuilles matures peut présenter un problème. Nous recommandons d'utiliser des tissus aussi frais que possibles, mais certainement moins d'une semaine après la collecte. Nous n'avons pas réussi à congeler ces tissus à l'état entier ou de blocs et à maintenir l'activité enzymatique. Les modes opératoires suivants ont été utilisés dans notre laboratoire: (1) congélation rapide dans l'azote liquide pendant 3-10 secondes, avec stockage subséquent dans un congélateur horizontal (env. -20°C); (2) congélation lente des tissus dans un congélateur horizontal. Les résultats étaient les mêmes: perte complète de l'activité enzymatique sauf dans le cas de certains locus très fréquents de peroxydase. Nous recommandons de garder les feuilles au frais (2-4°C), humides (80 % HR), et de les utiliser moins d'une semaine après le prélèvement.

Bien qu'aucun examen microscopique n'ait été effectué, nous croyons que le problème présenté par la congélation en bloc est la rupture des parois cellulaires, qui expose les enzymes à des métabolites secondaires les dénaturant. Si le stockage à long terme est nécessaire, nous recommandons que les tissus soient homogénéisés et congelés immédiatement ou après centrification. De nombreux autres laboratoires travaillant avec des insectes, du sang de mammifères et des plantes annuelles ont constaté que cette méthode de stockage était efficace pour des périodes de plusieurs années. La mécanisation de ce procédé peut être effectuée après quelques opérations supplémentaires de préparation.

2.322 Gymnospermes

Le stockage à long terme des feuilles mûres de gymnospermes peut être accompli en suivant le mode opératoire décrit pour les bourgeons. Nous avons stocké des tissus d'aiguilles mûres en période de dormance dans un congélateur horizontal ordinaire (à env. -20°C) pendant des périodes atteignant jusqu'à un an sans diminution apparente de l'activité enzymatique.

Pour certaines espèces de conifères, (par exemble, Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco, le Douglas taxifolié et Larix laricina (DuRoi) K. Koch, le mélèze), un effet ontogénétique apparent est associé à l'âge des tissus d'aiguilles. Les aiguilles de la première année ne contiennent pas des quantités suffisantes de protéines actives pour une détection par les méthodes de visualisation utilisées en électrophorèse, et on ne comprend pas très bien pourquoi. Donc, pour cette espèce, il faut tester du feuillage de la deuxième année aussi bien que des tissus plus jeunes. En outre, nous n'avons eu que peu de succès avec les aiguilles ayant poussé récemment, et surtout dans le cas de Picea. Le problème est que la teneur en phénolases et en protéases est trop élevée dans ces tissus pour être inactivée par nos modes opératoires d'extraction. Donc, nous recommandons que ces tissus ne soient pas échantillonnés avant leur première période de dormance.

Etant donné que les tissus d'aiguilles sont robustes et contiennent des

concentrations relativement faibles de protéines, il est nécessaire d'utiliser un mortier et un pilon pour préparer l'homogénat brut. Après le broyage, l'homogénat est placé dans des godets d'auto-analyseur pour le stockage. S'il faut les conserver pour la nuit, les homogénats peuvent être placés au réfrigérateur (à env. 4°C), recouverts de pellicule Saran ou de couvercles en plastique hermétiques pour éviter toute dessiccation. Toutefois, pour le stockage à long terme, nous recommandons de recouvrir les godets et de les placer au congélateur à environ -20°C.

Ces tissus d'aiguilles présentent certains problèmes nouveaux pour les tampons d'extraction. On trouvera plus de précisions dans Pitel et Cheliak 1983. Nous avons obtenu d'assez bons résultats en utilisant 75-100 mg de tissu à environ 0,5 ml de tampon d'extraction végétative II (annexe I).

2.33 Racines, écorces et tissus cambiaux

Des extrémités de racines à croissance active, surtout celles de jeunes semences, sont une source de tissus dont les enzymes peuvent être extraites facilement. La mécanisation des analyses est simple, étant donné que les tissus sont mous et pleins de sucre. Parce que ces tissus sont raisonnablement propres, une version modifiée du tampon d'extraction végétatif I (en diminuant les quantités de PVP 360 M) peut être utilisée avec succès. En général, 5-30 mg de tissus frais avec 0,1-0,5 ml de tampon d'extraction suffisent pour 3-5 languettes.

Dans certains cas, il peut être nécessaire, ou souhaitable, d'utiliser des tissus de l'écorce ou du cambium. Parce que ce tissu est résistant et comporte de faibles concentrations de protéines, il est préférable d'utiliser un mortier et un pilon pour l'homogénéisation. Nous avons extrait avec succès des enzymes de ces tissus en utilisant le tampon végétatif I. Dans un certain nombre d'espèces, le nombre des enzymes obtenus à partir de l'écorce est en général beaucoup plus faible que dans le cas des bourgeons ou des aiguilles. Il est donc recommandé de n'utiliser des tissus de l'écorce et du cambium que si d'autres tissus ne sont pas disponibles.

Des échantillons de tissus de l'écorce ont été obtenus pendant la période de dormance. Des grosses branches (diam.: 5-10 mm) ont été coupées et placées dans des sacs de plastique épais et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse. Habituellement, 200 mg d'écorce étaient enlevés de la branche et placés pour broyage avec 0,5 ml de tampon d'extraction dans un mortier refroidi.

3 PRÉPARATION DE L'HOMOGÉNAT

Le but de l'homogénéisation est la rupture des cellules de tissus et l'introduction d'enzymes dans une solution d'extraction tamponnée. Un grand nombre de méthodes d'homogénéisation sont décrites dans la littérature. Toutefois, la plupart de ces méthodes nécessitent un broyage manuel d'une quantité relativement importante de tissus. Là où la chose était possible, nous avons mécanisé le processus d'homogénéisation, afin de diminuer le temps de préparation des échantillons. Les tissus qui ne conviennent pas à l'homogénéisation mécanique sont, entre autres, les aiguilles de conifères, les feuilles matures de certains angiospermes, ainsi que les tissus de l'écorce et du cambium de toutes les espèces. Dans ces cas, la quantité de tissus requise est réduite au minimum.

3.1 MATÉRIEL

3.11 Homogénéisation mécanique

D'habitude, on utilise des godets d'auto-analyseur de 0,5 ml à fond conique comme récipient de broyage. Ils sont peu coûteux, (env. 0,1-0,3 cent chacun), durables et, ce qui est plus important, jetables. Ceci élimine la contamination entre les échantillons. Un support comportant des trous de dimensions appropriées est utilisé comme porte-godets. Ces supports peu coûteux peuvent être construits de bien des façons en fonction du plan d'échantillonnage d'une étude particulière.

Le pilon de broyage consiste en un embout de teflon compatible avec le contour intérieur du godet d'échantillonnage et attaché à une tige de ¼ de po, qui est ensuite montée sur un broyeur motorisé, de préférence de type lent et puissant (figure 2).

Figure 2. Dispositif d'homogénéisation pour tissus végétatifs et semences.

Le broyage des mégagamétophytes ou des petits embryons nécessite habituellement moins de cinq secondes. Pour les tissus végétaux plus robustes, un embout en teflon moleté est utile, mais non essentiel. Ce tissu peut habituellement être homogénéisé en moins de 15 secondes par échantillon. Il est important de conserver l'homogénat froid pendant tout le processus de broyage parce que de nombreuses protéines peuvent être dénaturées par le chauffage, mais non par le froid. Par exemple, si l'albumine de l'oeuf (une protéine) est gelée, elle peut être dégelée et reprendre son état d'avant la congélation. Toutefois, si l'oeuf est frit, il ne peut retourner à son état original. C'est essentiellement ce qui arrive à certaines protéines enzymatiques quand elles sont chauffées. Il est donc essentiel d'effectuer toutes les opérations, sauf l'incubation, à moins d'environ 4°.

3.12 Broyage manuel

Pour les tissus végétaux robustes, nous utilisons un petit mortier et un pilon avec du sable. Pour minimiser le temps de broyage, ainsi que la possibilité d'excès de protéines dans le gel, on ne broie que la plus petite quantité de tissus permettant de voir la trace des enzymes. Habituellement, 50-200 mg de tissus avec 0,5-1,5 ml de tampon d'extraction suffisent. En général, la quantité maximum de tampon d'extraction doit être ajoutée à une quantité minimum de tissus. Ceci permet d'extraire les enzymes sans qu'elles ne soient dénaturées par les métabolites secondaires dans les tissus. Généralement, il sera nécessaire de déterminer empiriquement les rapports optimaux tissus/tampon d'extraction pour différentes espèces et divers laboratoires.

4 LANGUETTES D'ÉCHANTILLONS

Après l'homogénéisation, des extraits bruts doivent être absorbés sur des matières appropriées pour introduction dans les gels. La taille et le poids absolus des languettes dépendent de chaque gel et des concentrations de protéines dans l'homogénat. La largeur des languettes d'échantillons influe aussi sur le nombre de points qui peuvent être utilisés dans un gel ainsi que sur le nombre de languettes qui peuvent être préparées à partir d'un échantillon donné.

4.1 DIMENSIONS

Pour utiliser le plus commodément la profondeur du gel, les languettes doivent être légèrement plus longues que la profondeur finale du gel. La largeur de la languette peut influer sur la résolution d'une protéine. Ceci est particulièrement évident aux tensions plus élevées. En général, à mesure que la tension appliquée au gel augmente, la largeur des languettes d'échantillons doit également augmenter. Toutefois, pour la plupart des travaux de routine, qu'il s'agisse de tissus diploïdes ou haploïdes, nous utilisons une languette de 1,5 mm de largeur. Cette largeur permet de faire entre 60 et 70 points sur les gels et assure une bonne résolution. Des languettes de 2-4 mm de largeur sont recommandées pour les photographies de gel destinées à des illustrations.

4.2 POIDS

Le poids de la languette influe non seulement sur le nombre qu'on peut obtenir d'un échantillon particulier, mais aussi sur la concentration de la protéine placée sur le gel. On n'obtiendra qu'une faible résolution si on place trop de protéines en quantité absolue sur le gel. Ainsi il est nécessaire de faire des essais avec différents poids de languettes pour des sous-ensembles d'enzymes déposés sur un gel donné. En outre, le rapport tissus/tampons d'extraction peut être ajusté pour faciliter la résolution de ces problèmes. Nous utilisons habituellement des languettes d'échantillons faites de papier filtre Whatman n° 3. Toutefois, si un compromis approprié ne peut être obtenu en ajustant le poids des languettes et la concentration d'une protéine particulière, il peut être nécessaire de réduire les quantités de substrats et de co-facteurs ajoutés à la formule de coloration.

4.3 INSERTION DANS L'HOMOGÉNAT

Le nombre prévu de languettes à utiliser un jour donné doit être inséré simultanément dans l'homogénat, afin que toutes les languettes reçoivent des quantités approximativement égales d'homogénat. Nous recommandons que les languettes soient insérées dans l'homogénat juste avant leur insertion dans les gels, afin de réduire la quantité d'homogénat perdue par évaporation.

5 PRÉPARATION DU GEL D'AMIDON ET ÉLECTROPHORÈSE

5.1 MOULES À GEL ET CUVES À SOLUTION TAMPON

Il y a plusieurs possibilités pour mouler les gels. Le système suivant est rapide, souple et relativement peu coûteux. Le moule que nous utilisons est une variante de celui de F.C.H. Yeh (ministre des Forêts de la C.-B.). Les moules à gels sont formés par quatre bandes de plexiglas (26 mm x 260 mm ou 177 mm x 12 mm), deux de chaque longueur, fixées à une plaque de plexiglas de 177 mm x 260 mm x 12 mm avec de grosses pinces à papier placées sur les côtés de 177 mm de façon à retenir les extrémités, et des petites pinces à papier sur les côtés de 260 mm pour servir de guide (figure 3). Une fois monté, tout le dispositif est placé au niveau à l'aide d'un petit niveau à l'alcool, parce que toute variation de l'épaisseur du gel entraîne une modification de la capacité et, par conséquent, des vitesses de migration variables du front du solvant et des protéines.

Les cuves à solution tampon sont constitués par des tiroirs "Rubbermaid" (7 cm x 23 cm). Un trou est percé à la partie supérieure d'une extrémité et pourvu d'une fiche banane femelle à cote de couleur à laquelle un fil de platine est soudé à l'argent. Les cuves sont ensuite placées dans un support en bois pour éviter tout renversement accidentel (figure 4). On utilise des chiffons absorbants jetables (chiffons J) pour établir des ponts entre les languettes de façon à boucler le circuit entre les solutions d'électrolyte dans les cuves de tampon et le gel.

5.2 PRÉPARATION DU GEL

Les gels sont la première chose à faire le matin, car il faut suffisamment de temps pour les refroidir à environ 4°C. Bien que les gels préparés le jour précédent et refroidis pendant toute la nuit semblent être plus résistants, leur résolution des protéines semblent être fortement réduite. Donc, nous recommandons le mode opératoire ci-dessous.

Une quantité appropriée d'amidon est pesée la veille et placée dans un Erlenmeyer de 1000 ml en verre épais à l'aide d'un manchon à ouverture latérale. Les solutions concentrées de tampon sont décantées, diluées aux volumes appropriés et placées au réfrigérateur. Les deux contenants sont recouverts de parafine.

Environ 1/5 du tampon est ajouté à l'amidon sec de façon à obtenir une suspension exempte de grumaux. Le reste du tampon est chauffé, soit au four à micro-ondes ou sur un bec Bunsen, jusqu'à ébullition rapide, puis environ la moitié du tampon chauffé est ajoutée à la suspension d'amidon et agitée vigoureusement. La suspension d'amidon deviendra très visqueuse. Le reste du tampon est ajouté rapidement avec agitation vigoureuse. Cette solution d'amidon est ensuite chauffée à nouveau jusqu'à ce qu'elle commence à bouillir. L'amidon est "cuit" quand la solution devient semi-transparente, par opposition à opaque. À ce point, la "cuisson" est interrompue.

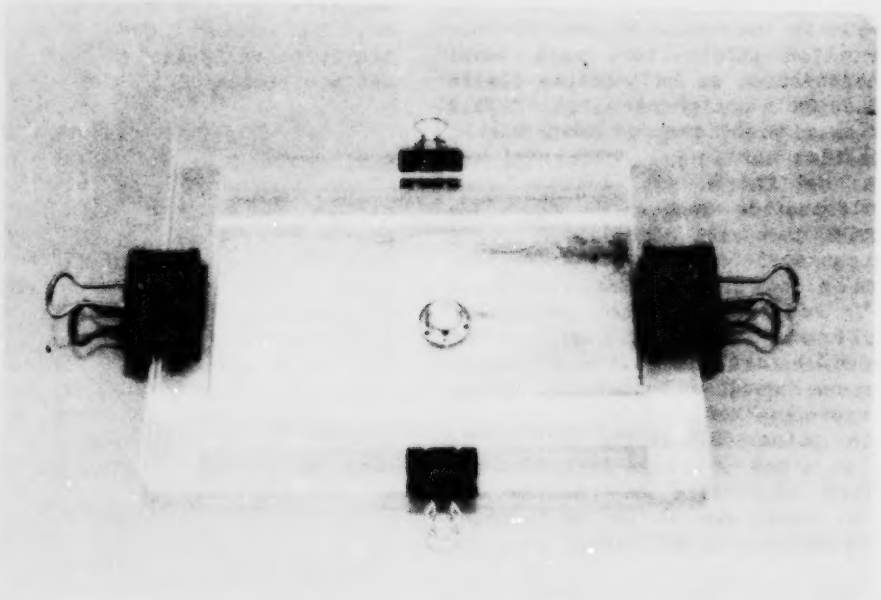

Figure 3. Moule à gel.

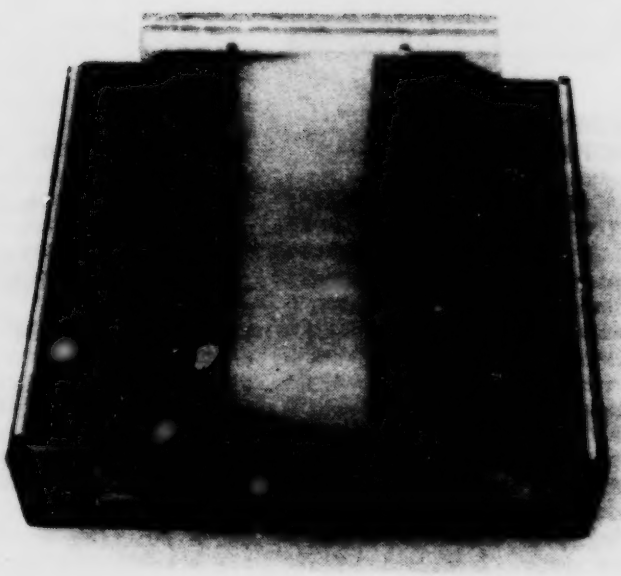

Figure 4. Moule à gel et cuve à tampon munie d'électrodes.

Il est nécessaire de mettre la solution sous vide jusqu'à ce qu'il ne reste que des grosses bulles (il faut habituellement de 20 secondes à 2 minutes, selon la solution tampon). La solution est ensuite versée dans les moules à gel et on la laisse durcir. Après environ 20 minutes, une pellicule de plastique doit être placée sur le gel pour éviter toute déshydratation. Les moules sont placés au réfrigérateur. Les gels sont prêts à être utilisés après élimination de l'excès d'amidon et refroidissement à environ 4°C.

5.3 INSERTION DES ÉCHANTILLONS DANS LE GEL

Pour déterminer le point d'insertion des languettes, on coupe le gel à environ 2,5 cm de l'emplacement prévu de la cathode. La bande obtenue est reculée d'environ 5 mm pour faciliter l'insertion. Une languette d'échantillons est retirée avec soin de godet à échantillon, asséchée légèrement sur un mouchoir de papier pour enlever tout excès d'homogénat, et placée contre le côté anode du sillon dans le gel. Il faut espacer les languettes de 1-1,5 mm. On utilise du colorant alimentaire rouge comme colorant de repérage; celui-ci est déposé dans les deux fentes d'un côté ou de l'autre du gel. Après l'insertion dans le gel, la bande cathodique est pressée fermement à sa position originale. Il est très important que les deux pièces de gel soient vraiment en contact l'une avec l'autre, sinon le tampon ne traversera pas de façon nette dans la plaque d'amidon.

5.4 INTRODUCTION DES PROTÉINES DANS LE GEL ET ESSAIS

Après l'insertion dans les gels et la mise en place de la bande cathodique, les échantillons sont prêts pour l'électrophorèse. La pellicule de plastique est retirée d'environ 1,5 cm des extrémités cathodiques et anodiques, et les bandes servant de pont (chiffons J), qui doivent être saturées de tampon, sont appliquées à la surface du gel. Il faut veiller à ce qu'il n'y ait pas de poches d'air ou de plis dans les bandes utilisées comme pont, et voir à ce qu'elles s'étendent jusqu'aux extrémités du gel. Après avoir placé les ponts sur le gel, la pellicule de plastique est replacée. On met ensuite le système sous tension.

On applique d'abord au gel une tension égale à la moitié de la tension totale de l'essai jusqu'à ce que le colorant (colorant alimentaire rouge, ou bleu de bromphénol) ait migré d'environ 3-5 mm dans le gel (habituellement en 10-15 minutes). Les languettes d'échantillons sont ensuite retirées du gel, la bande cathodique est poussée fermement contre la plaque anodique et la tension maximum d'essai est appliquée. Bien qu'il soit souhaitable d'effectuer les essais au réfrigérateur, cela n'est pas absolument nécessaire. Le refroidissement des gels sur la table de laboratoire peut être réalisé en plaçant de la glace broyée dans un sac "zip-lock" ou des sacs gelés dans des plateaux (remplis d'eau) placés sur une feuille de plexiglas à la surface supérieure du gel.

L'électrophorèse continue jusqu'à ce que le front de la solution tampon (indiqué par le colorant) ait migré sur une distance suffisante. Pour la majorité des espèces et des tissus, une distance de migration de 5-8 cm (3-5 heures d'électrophorèse) est suffisante pour une résolution et une séparation nettes de la plupart des allèles.

6 DÉCOUPAGE ET COLORATION

6.1 DÉCOUPAGE DES GELS

Par rapport aux gels d'acrylamide, les gels d'amidon présentent le grand avantage de pouvoir être découpés et colorés simultanément pour un grand nombre de systèmes enzymatiques. Pour découper les gels, nous utilisons des guides de plexiglas (20 x 260 x 1 mm) et du fil de nylon (fil invisible) ou du fil à pêche de nylon à faible résistance, qui est déplacé sous tension le long des guides. Un poids, habituellement un plateau de coloration partiellement rempli d'eau froide glacée, est placé sur la partie supérieure du gel pour l'empêcher de glisser de la plaque de base. Des guides sont placés près du gel et le fil est glissé à travers les gels vers la personne qui découpe. Quand on atteint la partie supérieure du gel, la tranche supérieure est rejetée et le gel est marqué d'une façon ou d'une autre pour indiquer une extrémité et son identité. Nous pratiquons habituellement une entaille sur le coin supérieur gauche du gel.

6.2 COLORATION DES GELS

Après le découpage des gels, il est nécessaire de transférer les tranches dans des plateaux de coloration séparés. À cette fin, il faut éviter de briser les tranches pendant le transfert. On trouvera dans l'annexe II des précisions sur les formules des colorants. Parce que les colorants coûtent cher, nous avons réduit au minimum les quantités de produits chimiques nécessaires pour colorer plusieurs tranches de gel. Toutefois, plus les tranches de gel sont épaisses, plus il faut de solution tampon colorante. En outre, si les cuves de coloration sont très grandes par rapport aux dimensions de la tranche de gel, la quantité de solution de colorant devra également être augmentée. Donc, il est préférable d'utiliser une tranche aussi mince que possible dans une cuve juste un peu plus large que les tranches de gel à colorer.

7 NOTATION DES VARIANTES ALLOZYMATIQUES

Il est nécessaire de caractériser les variantes allozymatiques pour être en mesure de les noter et de les enregistrer de façon cohérente. Il y a plusieurs façons de le faire. Dans la plupart des études d'arbres forestiers, on numérote les loci d'isozymes (pour les systèmes à loci multiples) séquentiellement de l'anode à la cathode. Les variantes allozymatiques sont ensuite caractérisées selon leur locus. À cette fin, on compare habituellement la distance de migration de l'allozyme avec un étalon. De façon plus particulière, la distance de migration d'un allozyme commun au sein d'un locus est mesurée et comparée à la distance totale de migration du front de la solution tampon. Cette valeur est appelée le R_f d'un locus particulier. Toutes les variantes allozymatiques observées à ce locus sont ensuite mesurées par rapport à l'allozyme commun. Cette valeur est appelée le R_m d'un allozyme particulier et est obtenue par le rapport suivant:

$$R_m = \frac{\text{distance de migration de la variante (mm)}}{\text{distance de migration de l'étalon (mm)}}$$

On donne une valeur numérique séquentielle à la nouvelle variante allozymatique et cette valeur est associée à un R_m particulier.

Par exemple, considérons le gel hypothétique montré dans la figure 5. Il y a deux loci d'isozymes pour cet enzyme. Dans le cas du premier locus, l'allozyme commun migre à R_f = 0,71; l'allozyme commun, dans le cas du deuxième locus, migre à R_f = 0,36. Au locus 1, quatre allèles ont été détectés. L'allèle commun

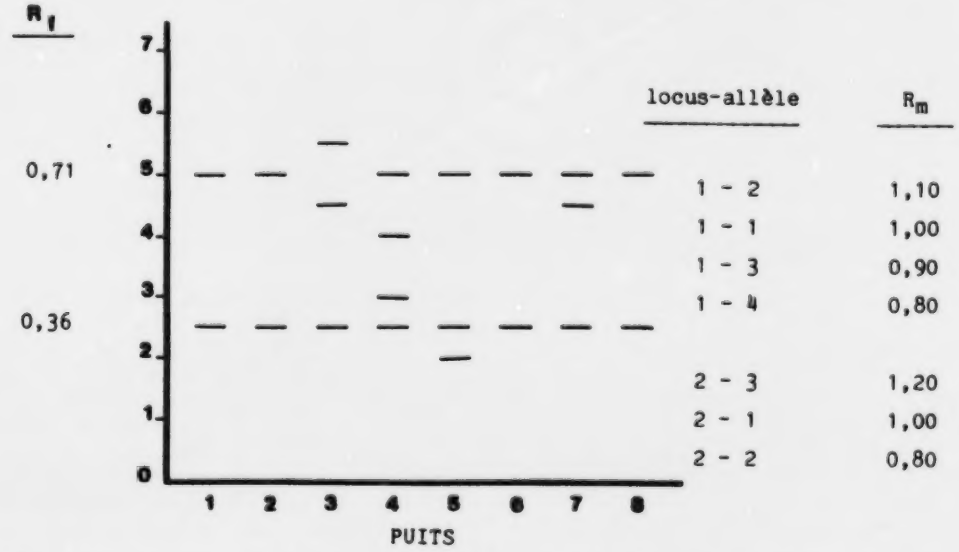

Figure 5. Gel hypothétique présentant des variantes allozymatiques à deux loci.

a par conséquent une valeur de R_m = 1,00. Les allozymes additionnelles à ce locus (2, 3, 4) sont toutes caractérisées par leur distance de migration par rapport à l'allèle 1. La même procédure est utilisée pour caractériser les allèles au locus 2.

La caractérisation des isozymes et des allozymes de cette façon pour une espèce permet d'effectuer des comparaisons avec d'autres laboratoires en autant que les conditions d'électrophorèse (systèmes de tampons, etc.), sont constantes. Les distances de migration et les R_m ne doivent être utilisés que comme des guides et non comme des valeurs absolues, car elles comportent un écart type. On obtiendra des valeurs légèrement différentes de R_m avec différentes concentrations de gel et de petites différences de pH. Ainsi, un allèle qui migre à 0,96 dans un cas ne sera pas nécessairement différent d'un autre qui migre à 0,95 dans un autre cas.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr B.P. Dancik, Université de l'Alberta, qui a révisé le manuscrit, et M.P. Copis pour la conception de la page couverture et la photographie.

ANNEXE I

Solutions tampon d'extraction

Tampon d'extraction pour semences

10 ml	Tampon de Tris-citrate (pH 7,0)
0,4 mM	NAD
0,2 mM	NADP
0,001M	Acide ascorbique
0,001M	EDTA (disodium)
0,1%	Albumine de sérum de bovin

Régler le pH à 6,8 - 7,5 avec du Tris 0,1M et ajouter 5 gouttes de β-mercaptoéthanol.

Tampon d'extraction végétatif I

8%	PVP (7:1 of 40M; 360M)
0,3M	Sucrose
0,5 mM	EDTA
1 mM	Dithiothréitol
1 mM	Acide ascorbique
0,1%	Albumine de sérum de bovin
0,4 mM	NAD
0,3 mM	NADP
0,2 mM	Pyridoxal 5'-phosphate

Régler le pH à 6,7 avec du Tris 1M et ajouter 0,66 ml de β-mercaptoéthanol par 100 ml de tampon.

Tampon d'extraction végétatif II

2%	Tergitol 15-S-9
2%	PEG (20M)
8%	PVP (7:1 40M; 360M)
50 mM	Acide ascorbique
0,4 mM	NAD
0,1%	Albumine de sérum de bovin
0,2 mM	Pyridoxal 5'-phosphate
0,3 M	Sucrose
12 mM	Cystéine-HCℓ
0,66 ml	β-mercaptoéthanol

Dissoudre dans du tampon de borate 0,05M (pH 7,1); volume final de 100 ml. Réajuster le pH à la fin.

ANNEXE II

Formules pour la préparation du gel,
de tampons à électrodes et à colorant,
et d'enzymes

ANNEXE II

Formules pour la préparation du gel, de tampons à électrodes et à colorant, et d'enzymes

Article	Page
Tampons pour gel et électrodes	21
Formules de tampons de colorant	22
Solutions mère de colorants	23
Solution de fixatif pour gel	23
Formules pour enzymes	
Acide shikimique-déshydrogénase (SDH; E.C.1.1.1.25)	24
Aconitase (ACO; E.C.4.2.1.3)	24
Adénylate-kinase (AK; E.C.2.7.4.3)	24
Alcool-déshydrogénase (ADH; E.C.1.1.1.1)	25
Aldolase (ALD; E.C.4.1.2.13)	25
Aspartate-aminotransférase (AAT; E.C.2.6.1.1)	25
Catalase (CAT; E.C.1.11.1.6)	26
Cytochrome-oxydase (CTO; E.C.1.9.3.1)	26
Diaphorase (DIA; E.C.1.6.4.3)	26
Enzyme malique (ME; 1.1.1.40)	26
Estérase (colorimétrie) (EST; E.C.3.1.1.1)	27
Estérase (fluorescent) (F-EST; E.C.3.1.1.1)	27
Fumarase (FUM; E.C.4.2.1.2)	27
β-Galactosidase (β-GAL; E.C.3.2.1.23)	27
Glucose-déshydrogénase (GLUDH; E.C.1.1.1.47)	28
Glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD; E.C.1.1.1.49)	28
β-Glucosidase (β-GLU; E.C.3.2.1.21)	28
Glutamate-déshydrogénase (GDH; E.C.1.4.1.3)	28
Glutamate-pyruvate-transaminase (GPT; E.C.2.6.1.2)	29
Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (G_3PDH; E.C.1.2.1.12)	29
Glycérate-2-déshydrogénase (G_2DH; E.C.1.1.1.29)	29
α-Glycérophosphate-déshydrogénase (α-GPDH; E.C.1.1.1.8)	30
Hexokinase (HK; E.C.2.7.1.1)	30
Hexoseaminidase (HA; E.C.3.2.1.30)	30
Isocitrate-déshydrogénase (IDH; E.C.1.1.1.42)	30
Leucine-amino-peptidase (LAP; E.C.3.4.11.1)	31
Malate-déshydrogénase (MDH; E.C.1.1.1.37)	31
Mannose-6-phosphate-isomérase (MPI; E.C.5.3.1.8)	31
Ménadione-réductase (MR; E.C.1.6.99.2)	32
Nicotinamide-adénine-dinucléotide-déshydrogénase (NADHDH; E.C.1.6.99.3)	32
Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate-déshydrogénase (NADPHDH; E.C.1.6.99.1)	32
Peptidase (PEP; E.C. 3.4.13.11)	32
Peroxydase (PER; E.C.1.11.1.7)	33
Phosphatase acide (ACP; E.C.3.1.3.2)	33
Phosphatase alcaline (ALP; E.C.3.1.3.1)	33
Phosphoénolpyruvate-carboxylase (PC; E.C.4.1.1.31)	34
Phosphoglucomutase (PGM; E.C.2.7.5.1)	34
6-Phosphogluconate-déshydrogénase (6PGD; E.C.1.1.1.44)	34
Phosphoglucose-isomérase (PGI; E.C.5.3.1.9)	35
Polyphénol-oxydase (PPO; E.C.1.14.18.1)	35
Protéines (en général)	35
Pyruvate-kinase (PK; E.C.2.7.1.40)	35
Succinate-déshydrogénase (SUDH; E.C.1.3.99.1)	36

Formules pour enzymes (suite) Page

Superoxyde-dismutase (SOD; E.C.1.15.1.1) 36
Formules supplémentaires 37
Produits chimiques décrits dans le présent manuel 39

Abréviations

NAD: β-nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADH: β-nicotinamide-adénine-dinucléotide, forme réduite
NADP: β-nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique
PEG: Polyéthylène-glycol
PVP: Polyvinylpyrrolidone
Tris: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
NBT: Bleu de nitro-tétrazolium
MTT: Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
PMS: Méthosulfate de phénazine
ADP: Adénosine-5'-diphosphate
ATP: Adénosine-5'-triphosphate

Tableau A2.1. Composition des tampons pour gel et électrodes utilisés pour électrophorèse sur gel d'amidon et conditions d'électrophorèse

Nom	Tampon		Courant
	Gel	Électrode	
B	Tris 0,03 M Acide citrique 0,005 M (anhydre) Tampon à électrodes à 1 % pH 8,5 (solution concentrée 10X)	Hydroxyde de lithium 0,06 M Acide borique 0,3 M pH 8,1	50 mA
H	Histidine-HCl 0,05 M EDTA 1,40 mM (pH 7,0 avec Tris 1,0 M) Solution mère diluée, 4:1	Tris 0,125 M pH 7,0 (avec acide citrique 1 M)	50 mA

Formules de tampons de colorant

(1) Acide malique 0,5 M:

(a) 67,2 g d'acide DL-malique à 800 ml d'eau distillée
(b) Régler le pH à 7,0 avec du NaOH 10N
(c) Porter le volume à 1 litre

(2) Acétate 0,2M, pH 5,0:

Acétate de sodium	11,49 g
Acide acétique glacial	3,6 ml
Eau distillée	pour obtenir 1 litre

(3) Tris- HCℓ 0,2 M, pH 8,0:

Base Trizma	24,22 g
Eau	750 ml
Régler le pH avec du HCℓ	
Eau distillée	pour obtenir 1 litre

(4) Citrate 0,05 M - phosphate 0,05 M, pH 4,0:

Na_2HPO_4 (anhydre)	3,55 g
Acide citrique (anhydre)	5,25 g
Eau distillée	500 ml

(5) Phosphate 0,2 M (pH 7,0 ou 6,4):

(a) Na_2HPO_4 28,4 g
(phosphate de sodium dibasique, anhydre)
Eau distillée pour obtenir 1 litre

(b) Régler le pH avec 1M NaH_2PO_4
(138 g/litre de phosphate de sodium monobasique monohydraté)

Solutions mère de colorants

Réactif	Concentration	Stockage
NAD	10 mg/ml	4°C
NADP	10 mg/ml	4°C
NBT	10 mg/ml	à l'obscurité à 4°C
MTT	10 mg/ml(H)	à l'obscurité à 4°C
PMS	5 mg/ml	à l'obscurité à 4°C
$MgCl_2$	10 mg/ml (1%)	T.A.
$MgCl_2$	100 mg/ml (10%)	T.A.
Glucose-1,6-diphosphate	0,1 mg/ml	4°C
Acide malique, pH 7,0	0,5 M	T.A.
Acide cis-aconitique, pH 8,0	5% (pds/vol)	4°C
Isocitrate-déshydrogénase	20 unités/ml	4°C
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	25 unités/ml	4°C
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	5 unités/ml	4°C
Hexokinase	250 unités/ml	4°C
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	150 unités/ml	4°C
Malate-déshydrogénase	300 unités/ml	4°C
Aldolase	50 unités/ml	4°C

Solutions de fixatif pour gel

400 ml	méthanol
100 ml	acide acétique
1000 ml	eau

Remarque:

T.A.: Température ambiante
H: Chauffer légèrement pour dissoudre

FORMULES POUR ENZYMES

Acide shikimique-déshydrogénase (SDH; E.C.1.1.1.25)

Formule du colorant:

50 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
25 mg	Acide (-) shikimique
1,0 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP
1,0 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: H

Aconitase (ACO; E.C.4.2.1.3)

Formule de colorant:

25 ml	Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0
2,5 ml	Acide cis-aconitique à 5 %, pH 8,0 (pds/vol)
20 unités	Isocitrate-déshydrogénase
0,5 ml	$MgCℓ_2$ à 1 %
0,5 ml	NADP
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

Tampon d'électrophorèse: H

Adénylate-kinase (AK; E.C.2.7.4.3)

Formule de colorant:

25 ml	Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0
50 mg	Glucose
25 mg	ADP (adénosine-5'-diphosphate)
125 unités	Hexokinase
25 unités	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
0,5 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP
0,5 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu-foncé (env. 120 min).

Tampon d'électrophorèse: H

Alcool-déshydrogénase (ADH; E.C.1.1.1.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0
5 ml	Éthanol (95% pds/vol)
0,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 120 min).

Tampon d'électrophorèse: B

Aldolase (ALD; E.C.4.1.2.13)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0
125 mg	Fructose-1,6-diphosphate (sel tétrasodique)
38 mg	Arséniate de disodium
150 unités	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
0,5 ml	NAD
0,5 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 60 min).

Tampon d'électrophorèse: H

Aspartate-aminotransférase (AAT; E.C.2.6.1.1)

Formule du colorant:

2 mg	Pyridoxal-5'-phosphate
50 mg	Sel fast blue BB
25 ml	Solution de substrat*

*Solution de substrat:

5,30 g	Acide L-aspartique et
0,70 g	Acide α-cétoglutarique, dissous dans 1 litre de Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0. Pour dissoudre, réajuster le pH à 8,0 avec du NaOH.

Tampon d'électrophorèse: B

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleues sur fond rose (env. 30 min).

Tampon d'électrophorèse: B

Catalase (CAT; E.C.1.11.1.6)

Formule du colorant:

(a) Laisser le gel tremper dans 50 ml de tampon à électrode B, pH 6,5, pendant 20 minutes à environ 0°C.

(b) Jeter la solution et tremper le gel pendant 60 secondes dans:

1 g	Iodide de potassium
50 ml	Eau distillée
1 ml	Acide acétique

(c) Laver 3 fois avec de l'eau et ajouter au gel:

50 ml	Eau distillée
0,5 ml	3 % H_2O_2

L'activité de la catalase est indiquée par des bandes blanches, alors que l'activité de la peroxydase est indiquée par des bandes bleues.

Tampon d'électrophorèse: B

Cytochrome-oxydase (CTO; E.C.1.9.3.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tampon de phosphate 0,1M, pH 7,2
18 mg	α-naphthol
18 mg	N,N-diméthyl-p-phénylènediamine
18 mg	Azotate de sodium

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes.

Tampon d'électrophorèse: B

Diaphorase (DIA; E.C.1.6.4.3)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M pH 8,0
0,5 mg	2,6-dichlorophénol-indophénol
13 mg	β-NADH
0,5 ml	MTT

Incuber à l'obscurité à 37°C (env. 45 min).

Tampon d'électrophorèse: B

Enzyme malique (ME; E.C.1.1.1.40)

Formule du colorant:

12,5 ml	Tampon d'électrode H
12,5 ml	Acide DL-malique 0,5M, pH 7,0
0,5 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP

0,5 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Laisser incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé.

Tampon d'électrophorèse: H

Estérase (colorimétrie) (EST; E.C.3.1.1.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tampon de phosphate 0,2M, pH 6,4
25 mg	De α-, et aussi de β-naphtylacétate dans 2,5 ml d'acétone
50 mg	Sel fast blue RR

Incuber à l'obscurité à T.A. jusqu'à l'apparition de bandes (env. 60 min).

Tampon d'électrophorèse: H,B

Estérase (fluorescent) (F-EST; E.C.3.1.1.1)

Formule du colorant:

10 ml	Tampon d'acétate de sodium 0,2M, pH 5,0
1 mg	Acétate de 4-méthylombelliféryle (dans 3 ml d'acétone)

Ajouter goutte à goutte au gel. Observer sous une lampe UV à 366 nm après une période comprise entre quelques minutes et une heure, selon les espèces.

Tampon d'électrophorèse: H

Fumarase (FUM; E.C.4.2.1.2)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0
200 mg	Fumarat de disodium
300 unités	Malate-déshydrogénase
2,0 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé.

Tampon d'électrophorèse: H

β-galactosidase (β-GAL; 3.2.1.23)

Formule du colorant:

5 ml	Tampon phosphate-citrate 0,05M, pH 4,0
10 mg	4-méthylombelliféryl-β-D-galactoside (dans 1 ml de N,N-diméthylformamide)

Incuber les gels à 37°C pendant 30-45 minutes. Observer sous une lampe UV (366 nm). L'activité enzymatique apparaît sous forme de bandes fluorescentes. Photographier

immédiatement à travers un filtre jaune. Remarque: l'α-galactosidase peut être colorée en utilisant la forme "α" du substrat ci-dessus.

Tampon d'électrophorèse: H

Glucose-déshydrogénase (GLUDH; E.C.1.1.1.47)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0
250 mg	Glucose
1,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes.

Tampon d'électrophorèse: H

Glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD; E.C.1.1.1.49)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0
100 mg	Glucose-6-phosphate
0,5 ml	1% $MgCl_2$ (pds/vol)
0,5 ml	NADP
0,5 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 90 min).

Tampon d'électrophorèse: H

β-glucosidase (β-GLU; E.C.3.2.1.21)

Formule du colorant:

5 ml	Tampon phosphate-citrate 0,05M, pH 4,0
10 mg	4-méthylombelliféryl-β-D-glucoside

Incuber les gels pendant 45 minutes à 37°C. Observer sous une lampe UV (366 nm). L'activité enzymatique apparaît sous forme de bandes fluorescentes. Photographier immédiatement à travers un filtre jaune.

Tampon d'électrophorèse: H

Glutamate-déshydrogénase (GDH; E.C.1.4.1.3)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0
200 mg	Acide L-glutamique
0,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber les gels à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 120 min).

Tampon d'électrophorèse: B

Glutamate-pyruvate-transaminase (GPT; E.C.2.6.1.2)

Formule du colorant:

5 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8.0
20 mg	L-alanine
10 mg	Acide α-cétoglutarique
150 unités	Acide L-lactique-déshydrogénase
15 mg	NADH

Ajouter goutte à goutte au gel. Observer sous une lampe UV (366 nm). L'activité enzymatique apparaît sous forme de bandes foncées de désfluorescence. Photographier immédiatement à travers le filtre jaune.

Tampon d'électrophorèse: H

Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (G_3PDH; E.C.1.2.1.12)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCl 0,2M, pH 8,0
125 mg	Fructose-1,6-diphosphate (sel tétrasodique)
38 mg	Arséniate de disodium
50 unités	Aldolase
0,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 120 min).

Tampon d'électrophorèse: H

Glycérate-2-déshydrogénase (G_2DH; E.C.1.1.1.29)

Formule du colorant:

5 ml	Tris-HCl 0,2M, pH 8,0
20 ml	Eau distillée
50 mg	Acide DL-glycérique (sel hémicalcique)
1,0 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé.

Tampon d'électrophorèse: H

α-glycérophosphate-déshydrogénase (α-GPDH; E.C.1.1.1.8)

Formule du colorant:

(a) Solution de substrat:

DL-α-glycérophosphate de disodium, 1,0M, pH 7.0

(b) Combiner:

2,5 ml	Solution de substrat ci-dessus
25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
1,0 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé.

Tampon d'électrophorèse: H

Hexokinase (HK; E.C.2.7.1.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
25 mg	Glucose
25 unités	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
6 mg	ATP
1 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: H

Hexoseaminidase (HA; E.C.3.2.1.30)

Formule du colorant:

5 ml	Citrate-phosphate 0,05M, pH 4,0
10 mg	4-méthylombelliféryl-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside

Ajouter goutte à goutte au gel et laisser incuber pendant 45 minutes à 37°C. Rincer le gel et asperger de NH_4OH 7,4N. Observer à la lumière UV (366 nm). L'activité enzymatique apparaît sous forme de bandes de fluorescence.

Tampon d'électrophorèse: H

Isocitrate-déshydrogénase (IDH; E.C.1.1.1.42)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
100 mg	Acide DL-isocitrique, sel trisodique

0,5 ml	$MgCl_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Laisser incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 60 min). Remarque: l'IDH est habituellement coloré sur le même type de gel que PGM (voir formule PGM).

Tampon d'électrophorèse: H

Leucine-amino peptidase (LAP; E.C.3.4.11.1)

Formule du colorant:

(a)	50 ml	Acide borique 0,5M
(b)	25 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0
	25 ml	Anhydride maléique 0,2M

Mélanger et régler le pH à 5,3 avec du NaOH 1,0N juste avant la coloration.

(c)	0,5 ml	$MgCl_2$ à 10 %
	25 mg	L-leucine β-naphthylamide-HCl
	35 mg	Sel fast black K

Tremper le gel dans (a) pendant 15 minutes. Jeter la solution. Mélanger (b) et (c) et ajouter au gel. Incuber à l'obscurité à 37°C. Remarque: la nécessité de tremper le gel dans (a) dépend de l'espèce.

Tampon d'électrophorèse: B

Malate-déshydrogénase (MDH; E.C.1.1.1.37)

Formule du colorant:

12,5 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0
12,5 ml	Acide DL-malique 0,5M, pH 7,0
0,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 45 min).

Tampon d'électrophorèse: H

Mannose-6-phosphate-isomérase (MPI; E.C.5.3.1.8)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0
25 mg	D-mannose-6-phosphate de baryum
50 unités	Phosphoglucose-isomérase
40 unités	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
2,5 ml	$MgCl_2$ à 1 %
0,5 ml	NADP
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé.

Tampon d'électrophorèse: H

Ménadione-réductase (MR; E.C.1.6.99.2)

Formule du colorant:

75 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 7,0
25 mg	Ménadione
25 mg	NADH
1 ml	NBT

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: H

Nicotinamide-adénine-dinucléotide-déshydrogénase (NADHDH; E.C.1.6.99.3)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
12,5 mg	NADH
1 ml	NBT

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: B

Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate-déshydrogénase (NADPHDH; E.C.1.6.99.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
12,5 mg	NADPH
1 ml	NBT

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: B

Peptidase (PEP; E.C.3.4.13.11)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
30 mg	L-leucyl-L-alanine
30 mg	L-leucyl-glycyl-glycine
30 mg	Glycyl-L-leucine
5 mg	Peroxydase brute
5 mg	Venin de serpent (Crotalus viridis helleri)
25 mg	O-dianisidine, dichlorhydrate
2,5 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)

Incuber à T.A. pendant au moins 6 heures jusqu'à l'apparition de bandes brunes.

Tampon d'électrophorèse: B

Peroxydase (PER; E.C.1.11.1.7)

Méthode n° 1

Formule du colorant:

(a) 15 ml 1% H_2O_2

(b) 15 ml Acide acétique à 20 % (vol/vol)
300 mg Benzidine, dichlorhydrate.
Mélanger.

Mélanger a) et b) et ajouter au gel. Incuber à T.A. jusqu'à l'apparition de bandes bleues. Photographier immédiatement.

Remarque: L'activité de la peroxydase peut également être observée avec la formule des colorants pour la catalase. Il faut prendre beaucoup de précautions quand on utilise de la benzidine.

Tampon d'électrophorèse: B

Méthode n° 2

Formule du colorant:

40 ml	Acétate de Na 0,2M, pH 5,0
50 mg	3-amino-9-éthyl-carbazole, dissous dans 5 ml de N,N-diméthylformamide
2 ml	Solution 0,1 M de $CaCl_2$
1 ml	Peroxyde d'hydrogène à 3 %

Phosphatase acide (ACP; E.C.3.1.3.2)

Formule de colorant:

25 ml	Tampon d'acétate de sodium 0,2M, pH 5,0
75 mg	α-naphthylphosphate acide de sodium
25 mg	Sel Fast Garnet GBC
2,5 ml	$MgCl_2$ à 1 % (pds/vol)

Incuber à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes brun-noir (env. 90 min).

Tampon d'électrophorèse: H

Phosphatase alcaline (ALP; E.C.3.1.3.1)

Formule du colorant:

50 ml	Eau distillée
25 mg	β-naphtylphosphate de sodium
25 mg	Fast blue RR
60 mg	$MgSO_4.7H_2O$
1,0 ml	$MgCl_2$ à 1% (pds/vol)

Incuber dans l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

Tampon d'électrophorèse: H

Phosphoénolpyruvate-carboxylase (PC; E.C.4.1.1.31)

Formule du colorant:

(a)	1,0 ml	Tris-HCℓ 1,0M, pH 7,0
	5,0 ml	Eau distillée
	250 mg	PVP
	0,5 ml	$MgCℓ_2$ à 10 % (pds/vol)
	50 mg	Phosphoénol-pyruvate
	10 mg	Bicarbonate de sodium
(b)	50 mg	Sel fast blue BB dans 2 ml d'eau distillée.

Verser a) sur le gel et incuber à 37°C pendant 20 minutes. Verser b) sur le gel et mélanger dans a).
Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: B

Phosphoglucomutase (PGM; E.C.2.7.5.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
150 mg	Glucose-1-phosphate, sel disodique
0,25 ml	Glucose-1,6-diphosphate, solution à 0,1 mg/ml d'eau
25 unités	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
0,5 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP
0,5 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 60 min).
Remarque: PGM et IDH sont habituellement déposés sur le même gel. Pour développer ces deux enzymes, on ajoute de l'acide DL-isocitrique (100 mg) et du NBT (0,5 ml) à la solution ci-dessus.

Tampon d'électrophorèse: H

6-phosphogluconate-déshydrogénase (6PGD; E.C.1.1.1.44)

Formule du colorant:

5 ml	Tris-HCℓ 0,2M, pH 8,0
10 mg	6-acide 6-phosphogluconique, sel trisodique
1 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
1 ml	NADP
1 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Ajouter goutte à goutte au gel. Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé (env. 45 min).

Tampon d'électrophorèse: H

Phosphoglucose-isomérase (PGI; E.C.5.3.1.9)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
12,5 mg	Fructose-6-phosphate, sel disodique
5 unités	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
0,5 ml	$MgCℓ_2$ à 1 % (pds/vol)
0,5 ml	NADP
0,5 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes bleu foncé.

Tampon d'électrophorèse: B

Polyphénol-oxydase (PPO; E.C.1.14.18.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tampon de phosphate 0,1M, pH 7,2
18 mg	Catéchol
18 mg	N,N-diméthyl-p-phénylènediamine
18 mg	Thiourée

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: B

Protéines (en général)

Formule du colorant:

2 g	Noir Amido
500 ml	Méthanol
500 ml	Eau distillée
100 ml	Acide acétique glacial

Mélanger et filtrer avant d'utiliser. Colorer les gels pendant 30 minutes à T.A. Décolorer avec une solution de fixatif.

Pyruvate kinase (PK; E.C.2.7.1.40)

Formule du colorant:

5 ml	Tris-HCℓ, 0,2M, pH 8,0
25 mg	Phosphoénolpyruvate, sel trisodique
2,5 mg	ADP
1 mg	Fructose-1,6-diphosphate
1 mg	EDTA
25 mg	KCℓ
150 unités	Lactate-déshydrogénase
15 mg	NADH
5 mg	$MgCℓ_2$

Ajouter goutte à goutte au gel. Observer sous une lampe UV (375 nm). L'activité enzymatique apparaît sous forme de bandes de défluorescence.

Succinate-déshydrogénase (SUDH; E.C.1.3.99.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tampon de phosphate 0,1M, pH 7,0
75 mg	Acide succinique, sel disodique
100 mg	EDTA, sel disodique
12,5 mg	ATP
0,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
1,0 ml	MTT
0,5 ml	PMS

Incuber à l'obscurité à 37°C.

Tampon d'électrophorèse: H

Superoxyde-dismutase (SOD; E.C.1.15.1.1)

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,05M (pH 8,2)
1 mg	Riboflavine
74 mg	EDTA, sel disodique
0,25 ml	NBT

Incuber les gels dans la solution de colorant à 37°C à l'obscurité pendant 20 minutes. Placer sur une boîte lumineuse fluorescente et illuminer pendant 20-30 minutes.

Tampon d'électrophorèse: B, H

Formules supplémentaires:

Enzymes qui ont donné de bons résultats dans d'autres études mais non pour les cinq espèces des essais végétatifs (Pitel et Cheliak 1984).

L-amino-acide-oxydase

Formule du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,14M, pH 7,5
69 mg	L-leucine
9 mg	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
0,5 ml	PMS

Choline déshydrogénase

Tampon du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,05M, pH 7,5
175 mg	Chlorure de choline
25 mg	$MgSO_4$
1,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Galactose-déshydrogénase

Tampon du colorant:

25 ml	Tris-HCℓ, 0,05M, pH 7,5
225 mg	D(+) galactose
25 mg	$MgSO_4$
1,5 ml	NAD
0,5 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Monoamine-oxydase

Formule du colorant:

25 ml	Phosphate 0,1M, pH 7,2
30 mg	Tryptamine-HCℓ
1,5 ml	NBT

Sorbitol-déshydrogénase

Tampon du colorant:

50 ml	Tris-HCℓ, 0,05M, pH 8,0
250 mg	D-sorbitol
1 ml	NAD
1 ml	NBT
0,5 ml	PMS

Sucrose-phosphorylase

Formule du colorant:

25 ml	Phosphate 0,003M, pH 6,9
1700 mg	Sucrose
25 mg	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium

Xanthine-déshydrogénase

Tampon du colorant:

50 ml	Tris-HCl, 0,05M, pH 7,5
400 mg	Hypoxanthine
1 ml	NBT
1 ml	NAD
0,5 ml	PMS
500 mg	KOH

PRODUITS CHIMIQUES DÉCRITS DANS LE PRESENT MANUEL

A. Colorants chimiques	N° de catalogue	Société chimique*
Acétate de 4-méthylombelliféryle	M-0883	S
Acétate de α-naphthyle	N-8505	S
Acétate de β-naphthyle	N-6875	S
Acide L-aspartique	A-9256	S
Acide α-cétoglutarique, sel monosodique	K-1875	S
Acide cis-aconitique	A-7251	S
Acide fumarique, sel disodique	F-1506	S
Acide L-glutamique, sel monosodique	G-1626	S
Acide DL-glycérique, sel hémicalcique	G-5626	S
Acide DL-isocitrique, sel trisodique	I-1252	S
Acide DL-malique	M-0875	S
Acide 6-phosphogluconique, sel trisodique	P-6888	S
Acide (-) shikimique	S-5375	S
Acide succinique	S-2378	S
ADP (adénosine-5'-diphosphate)	A-6646	S
L-alanine	A-7627	S
3-amino-9-éthylcarbazole	A-5754	S
Arséniate de sodium	A-6756	S
ATP (adénosine-5'-triphosphate)	A-5394	S
Azotate de sodium	S-2002	S
Benzidine, dichlorhydrate	B-3383	S
Bicarbonate de sodium	S-8875	S
Bleu de nitro tétrazolium (NBT)	N-6876	S
(Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2]yl-2,5-diphényltétrazolium) (MTT)	M-2128	S
Butyrate de 4-méthylombelliféryle	M-7759	S
Catéchol	P-370	F
Chlorhydrate de tryptamine	T-9628	S
Chlorure de choline	C-7017	S
Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium	T-8877	S
O-dianisidine	D-3127	S
2,6-dichlorophénol-indophénol	D-1878	S
N,N-diméthyl-p-phénylènediamine	D-5004	S
D-fructose-1,6-diphosphate, sel trisodique	752-1	S
D-fructose-6-phosphate, sel disodique	F-3627	S
D(+) galactose, anhydre	G-0625	S
α-D(+) glucose	G-5000	S
α-D-glucose-1,6-diphosphate, sel de potassium	G-5750	S
α-D-glucose-1-phosphate, sel disodique	G-7000	S
D-glucose-6-phosphate, sel monosodique	G-7879	S
DL-α-glycérophosphate, sel disodique	G-6126	S
Glycyl-L-leucine	G-2002	S
Hypoxanthine	H-9377	S
Iodure de potassium	P-8256	S
L-leucine	L-8000	S
L-leucyl-L-alanine	L-9250	S
L-leucyl-glycyl-glycine	L-9750	S
L-leucine-β-naphthylamide, chlorhydrate	L-0376	S
D-mannose-6-phosphate, sel de baryum	M-8754	S
Menadione	M-5750	S
Méthosulfate de phénazine (PMS)	P-9625	S
4-méthylombelliféryl-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside	M-2133	S

4-méthylombelliféryle-β-D-galactoside	M-1633	S
4-méthylombelliféryl-β-D-glucoside	M-3633	S
α-naphthol	N-1000	S
β-nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD)	N-0632	S
β-nicotinamide-adénine-dinucléotide, forme réduite (NADH), sel disodique	N-8129	S
β-nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate, forme réduite (NADPH)	N-1630	S
β-nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP), sel de sodium	N-0505	S
Peroxyde d'hydrogène	H-1009	S
Phosphate acide de β-naphthyle, sel de sodium	N-7375	S
Phosphate acide de α-naphthyle, sel monosodique	N-7000	S
Phosphoénol-pyruvate, sel trisodique	P-7002	S
Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)	PVP-40	S
Pyridoxal-5'-phosphate	P-9255	S
Riboflavine	R-4500	S
Sel Fast Black K	F-7253	S
Sel Fast Blue BB	F-3378	S
Sel Fast Blue RR	F-0500	S
Sel Fast Garnet GBC	F-6504	S
D-sorbitol	S-1876	S
Sucrose	S-9378	S
Thiourée	T-7875	S
Venin de serpent (Crotalus viridis helleri)	V-7752	S

B. Produits chimiques pour les tampons	N° de catalogue	Société chimique*
Acétate de sodium	S-209	F
Acide acétique, glacial	A-38	F
Acide borique	A-73	F
Acide citrique	C-0759	S
Base Trizma	T-1503	S
Ethylènediaminetétraacétate, sel disodique	S-311	F
DL-histidine, HCℓ	H-7875	S
Hydroxyde de lithium	L-4256	S
Phosphate de sodium, dibasique, anhydre	S-0876	S
Phosphate de sodium, monobasique, anhydre	S-0751	S

C. Produits chimiques divers	N° de catalogue	Société chimique*
Acétone	A-19B	F
Amidon	Lot 375-2	C
Amidon	Lot 392	E
Anhydride maléique	M-0625	S
Chlorure de magnésium	M-33	F
Chlorure de potassium	P-217	F
N,N-diméthylformamide	D-133	F
Ethanol (95 %)	-	-
Hydroxyde de potassium	P-250	F
Hydroxyde de sodium	S-318	F
Méthanol	A-408B	F
Sulfate de magnésium	M-65	F

D. Enzymes

	N° de catalogue	Société chimique*
Acide isocitrique-déshydrogénase	I-2002	S
Acide L-lactique-déshydrogénase	L-2500	S
Acide malique-déshydrogénase	M-7508	S
Aldolase	A-1893	S
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	G-7877	S
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	G-0763	S
Hexokinase	H-5500	S
Peroxydase, brute	P-8000	S
Phosphoglucose-isomérase	P-5381	S

*Remarque: Les sociétés chimiques sont les suivantes: (S) Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, Mo. 63178, E.-U.; (F) Fisher Scientific Limited, 112 Colonnade Road, Ottwa, Ontario K2E 7L6; (C) Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada; et (E) Electrostarch Co., P.O. Box 1294, Madison, Wisconsin, 53701. E.-U. Toute mention de l'utilisation de produits chimiques des compagnies ci-dessus ne constitue pas une approbation officielle du ministère de l'Environnement.

ANNEXE III

BIBLIOGRAPHIE

I. Modes opératoires électrophorétiques et formules de colorants.

Baum, J.A.; Scandalios, J.G. 1979. Developmental expression of intracellular localization of superoxide dismutase in maize. Differentiation 13: 133- 140.

Brewer, G.J. 1970. An introduction to isozyme techniques. Acad. Press, N.Y.

Conkle, M.T.; Hodgskiss, P.D.; Nunnally, L.B.; Hunter, S.C. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. U.S.D.A. Gen. Tech. Rept. PSW-64.

Harris, H.; Hopkinson, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland, Amsterdam.

Hamaker, J.M.; Snyder, E.B. 1973. Electrophoresis patterns of needle enzymes in longleaf and Sonderegger pines. U.S.D.A. For. Serv. Res. Note SO-151, 8 p. Southern Forest Exp. Sta., New Orleans, La.

Mitton, J.B.; Linhart, Y.B.; Sturgeon, K.B.; Hamrick, J.L. 1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. J. Hered. 70: 86-89.

Pitel, J.A.; Cheliak, W.M. 1982. Extraction and characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five conifers. In Proc. 7th North American Forest Biology Workshop, July 26-28, Lexington, Ky.

Pitel, J.A.; Cheliak, W.M. 1984. Effect of extraction buffer composition on characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five conifers. Environ. Can., Can. For. Serv., Petawawa Natl. For. Inst. Inf. Rep. PI-X-34.

Shaw, C.R.; Prasad, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: A compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.

Siciliano, M.J.; Shaw, C.R. 1976. Separation and visualization of enzymes on gels. Pages 185-289 in Smith, I. Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol 2. Zone electrophoresis. Heinemann, London.

Smith, I. 1976. Starch gel electrophoresis. Pages 153-184 in Smith, I. Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol. 2. Zone electrophoresis. Heinemann, London.

Yeh, F.C.H.; O'Malley, D. 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas-fir Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. Silvae Genet. 29: 83-92.

II. Méthodes d'échantillonnage, études de patrimoine et de liaisons chez les conifères.

Adams, W.T.; Joly, R.J. 1980. Genetics of allozyme variants in loblolly pine. J. Hered. 71: 33-40.

Adams, W.T.; Joly, R.J. 1980. Linkage relationships among twelve allozyme loci in loblolly pine. J. Hered. 71: 199-202.

Bergmann, F. 1973. Genetic studies in Picea abies with the aid of isozyme identification. II: Genetic control of esterase and leucine-aminopeptidase isozymes in haploid endosperm of dormant seeds. Theor. Appl. Genet. 43: 222-225.

Bergmann, F. 1974. The genetics of some isoenzyme systems in spruce endosperm (Picea abies). Genetica 6: 353-360.

Cheliak, W.M.; Pitel, J.A. 1984. Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees. J. Hered. 75: 34-40.

Conkle, M.T. 1971. Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine-aminopeptidase isozymes in knobcone pine. Forest Sci. 17: 190-194.

Conkle, M.T. 1981. Isozyme variation and linkage in six conifer species. Pages 11-17 in Conkle, M.T. ed. Isozymes of North American forest trees and forest insects. U.S.D.A. Gen. Tech. Rept. PSW-48.

El-Kassaby, Y.A.; Sziklai, O.; Yeh. F.C.H. 1982. Inheritance of allozyme variants in coastal Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii var. menziesii). Can. J. Genet. Cytol. 24: 325-335.

El-Kassaby, Y.A.; Sziklai, O.; Yeh, F.C.H. 1982. Linkage relationships among 19 polymorphic allozyme loci in coastal Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii var. menziesii). Can. J. Genet. Cytol. 24: 101-108.

King, J.N.; Dancik, B.P. 1983. Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (Picea glauca). Can. J. Genet. Cytol. 25: 430-436.

Guries, R.P.; Friedman, S.T.; Ledig, F.T. 1978. A megagametophyte analysis of genetic linkage in pitch pine (Pinus rigida Mill). Heredity 40: 309-314.

Guries, R.P.; Ledig, F.T. 1978. Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (Pinus rigida Mill). Heredity 40: 27-32.

Lundkvist, K. 1974. Inheritance of leucine aminopeptidase isozymes in Picea abies K. (Koch). Hereditas 76: 91-96.

Lundkvist, K. 1975. Inheritance of acid phosphatase isozymes in Picea abies. Hereditas 85: 67-74.

Lundkvist, K. 1977. Inheritance of esterases in needles and endosperms of Norway spruce (Picea abies K). Hereditas 87: 27-32.

Morris, R.W.; Speith, P.T. 1978. Sampling strategies for using female gametophytes to estimate heterozygosity in conifers. Theor. Appl. Genet. 51: 217-222.

O'Malley, D.M.; Allendorf, F.W.; Blake, G.M. 1979. Inheritance of isozyme variation and heterogeneity in Pinus ponderosa. Biochem. Genet. 17: 233-250.

Rudin, D. 1975. Inheritance of glutamate oxalate-transaminases (GOT) from needles and endosperms of Pinus sylvestris. Heredity 80: 296-300.

Rudin, D. 1977. Leucine aminopepitases (LAP) from needles and endosperms of Pinus sylvestris L. - a study of inheritance of allozymes. Hereditas. 85: 219-226.

Rudin, D.; Ekberg, I. 1978. Linkage studies in Pinus sylvestris, L. using macrogametophyte allozymes. Silvae Genetica 27: 1-12.

Tobolski, J.J. 1979. Inheritance of polymorphic isozymes in jack pine (Pinus banksiana Lamb.). Pages 147-154 in Proc. Forest North Central Tree Improvement Conf.

Yeh, F.C.H.; El-Kassaby, Y.A.; Khalil, M.A.K.; Chipman, D.C. 1984. Inheritance and linkage relationships of allozyme variants in black spruce. Can. J. Genet. Cytol. (Submitted).

III. Analyse des populations.

Guries, R.P.; Ledig, F.T. 1977. Analysis of population structure from allozyme frequencies. Pages 246-253 in Proc. 14th. South. Forest Tree Imp. Conf., Gainsville, Fla.

Guries, R.P.; Ledig, F.T. 1981. Genetic structure of populations and differentiation in forest trees. Pages 42-47 in Conkle, M.T. ed. Isozymes of North American forest trees and forest insects. U.S.D.A. Gen. Tech. Rept. PSW-48.

Guries, R.P.; Ledig, F.T. 1982. Genetic diversity and population structure in pitch pine (Pinus rigida Mill). Evol. 36: 387-402.

Linhart, Y.B.; Mitton, J.B.; Sturgeon, K.B.; Davis, M.L. 1981. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. Heredity 46: 407-426.

Lundkvist, K. 1979. Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (Picea abies K.). I. Estimates of genetic variation within and among populations, genetic linkage and mating system parameter. Hereditas 90: 127-143.

Lundkvist, K.; Rudin, D. 1977. Genetic variation in 11 populations of Picea abies in Sweden as determined by isozyme analysis. Hereditas. 85: 67-74.

Tigerstedt, P.M.A. 1973. Studies of isozyme variation in marginal and central populations of Picea abies. Hereditas 75: 47-60.

Wheeler, N.C.; Guries, R.P. Population structure, genic diversity, and morphological variation in Pinus contorta Dougl. Can. J. Forest Res. 12: 595-606.

Yang, J.C.; Ching, T.K.; Ching, K.K. 1977. Isoenzyme variation of coastal Douglas-fir. I. A study of geographic variation in three enzyme systems. Silvae Genet. 26: 10-18.

Yeh, F.C.H. 1981. Analysis of gene diversity in some species of conifers. Pages 48-52 in Conkle, M.T. ed. Isozymes of North American forest trees and forest insects. U.S.D.A. Gen. Tech. Rept. PSW-48, 64 p.

Yeh, F.C.H.; El-Kassaby, Y.A. 1979. Enzyme variations in natural populations of Sitka spruce (Picea sitchensis [Bong.] Carr). I. Genetic variation patterns in ten IUFRO provenances. Can. J. Forest Res. 10: 415-422.

Yeh, F.C.; Layton, C. 1979. The organization of genetic variability in central marginal populations of lodgepole pine, Pinus contorta ssp. latifolia. Can. J. Genet. Cytol. 21: 487-503.

IV. Analyse et évaluation des systèmes de croisement.

Brown, A.H.D.; Matheson, A.C.; Eldridge, K.G. 1975. Estimation of the mating system of Eucalyptus obliqua L'Herit. using allozyme polymorphisms. Aust. J. Bot. 23: 931-949.

Cheliak, W.M.; Morgan, K.; Strobeck, C.; Yeh, F.C.H.; Dancik, B.P. 1983. Estimation of mating system parameters in plant populations using the EM algorithm. Theor. Appl. Genet. 65: 157-161.

Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Allard, R.W. 1978. Estimation of life cycle components of selection in an experimental plant population. Genetics 89: 765-792.

Green, A.G.; Brown, A.H.D.; Oram, R.N. 1980. Determination of outcrossing rate in a breeding population of Lupinus albus L. (White Lupin) Z. Pflanzenzuchtg, 84: 181-191.

Ritland, K.; Jain, S.K. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using an independent loci. Heredity 47: 35-52.

Shaw, D.V.; Allard, R.W. 1982. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. Theor. Appl. Genet. 62: 113-120.

Shaw, D.V.; Kahler, A.L.; Allard, R.W. 1981. A multilocus estimater of mating system parameters in plant populations. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78: 1298-1302.

Yeh, F.C.H.; Brune, A.; Cheliak, W.M.; Chipman, D. 1983. Mating system of Eucalyptus citriodora in a seed-production area. Can. J. Forest Res. 13: 1051-1055.